

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-019292

(43)Date of publication of application : 21.01.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/00
C01B 33/18
C07H 1/06
C07H 21/04
C12Q 1/68
G01N 33/50
G01N 33/552
G01N 33/553
//(C12N 15/00
C12R 1:445)

(21)Application number : 07-172481

(71)Applicant : TOYOBO CO LTD

(22)Date of filing : 07.07.1995

(72)Inventor : UEMATSU HIROAKI
DAIMON KATSUYA
YOSHIGA SATOKO

(54) MAGNETIC CARRIER FOR BINDING NUCLEIC ACID AND NUCLEIC ACID ISOLATION USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject carrier with large surface area, capable of nonspecifically adsorbing a great quantity of nucleic acid, thus useful for nucleic acid detection, etc., by compounding an ultraparamagnetic metal oxide coated with silica with an inorganic porous wall substance consisting of fine silica particles.

SOLUTION: This carrier is obtained by compounding an ultraparamagnetic metal oxide (e.g. iron oxide) coated with silica with an inorganic porous wall substance consisting of fine silica particles. This carrier comprises magnetic silica particles 0.1-60nm in surface pore diameter, 0.01-1.5ml/g in pore volume and 100-800m²/g in specific surface area, being capable of nonspecifically adsorbing a great quantity of nucleic acid, thus being useful for extracting and purifying nucleic acid from nucleic acid-contg. biomaterials, purifying nucleic acid-amplified products, as a reagent for nucleic acid detection, etc. This magnetic carrier, after binding nucleic acid thereto, can be easily separated from a liquid by using magnetic field.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 13.08.1997

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 2965131

[Date of registration] 13.08.1999

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-19292

(43)公開日 平成9年(1997)1月21日

(51)Int.Cl. ⁹	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/00	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A Z
C 0 1 B 33/18			C 0 1 B 33/18	Z
C 0 7 H 1/06			C 0 7 H 1/06	
21/04			21/04	B
C 1 2 Q 1/68		9453-4B	C 1 2 Q 1/68	Z
審査請求 未請求 請求項の数14 O L (全 9 頁) 最終頁に続く				

(21)出願番号 特願平7-172481

(22)出願日 平成7年(1995)7月7日

(71)出願人 000003160

東洋紡績株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

(72)発明者 植松 宏彰

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72)発明者 大門 克哉

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(72)発明者 吉賀 聡子

滋賀県大津市堅田二丁目1番1号 東洋紡績株式会社総合研究所内

(74)代理人 弁理士 山本 秀策

(54)【発明の名称】 核酸結合用磁性担体およびそれを用いる核酸単離方法

(57)【要約】

【課題】 核酸を非特異的に多く吸着させることが可能な磁性粒子担体、およびこの担体を使用した簡単な操作で、有効に生物材料から核酸を単離する方法を提供する。

【解決手段】 超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリカ粒子が100~800m²/gの比表面積を有する核酸結合用磁性担体、上記担体を使用する核酸の単離方法、上記方法により単離された核酸を検出する方法、およびこれらの方法に使用する試薬キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子である核酸結合用磁性担体であって、該磁性シリカ粒子が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する、核酸結合用磁性担体。

【請求項2】 前記磁性シリカ粒子が、その表面がシリカで被覆されている超常磁性金属酸化物を、微小なシリカ粒子で構成される無機多孔性壁物質で複合してなり、そしてほぼ完全な球状である、請求項1に記載の核酸結合用磁性担体。

【請求項3】 前記超常磁性金属酸化物が酸化鉄である、請求項1に記載の核酸結合用磁性担体。

【請求項4】 前記超常磁性金属酸化物が $10\sim 60\text{wt}\%$ で含まれる、請求項1に記載の核酸結合用磁性担体。

【請求項5】 前記磁性シリカ粒子の表面細孔直径が $0.1\sim 60\text{nm}$ であり、かつ細孔容積が $0.01\sim 1.5\text{ml/g}$ である、請求項1から4のいずれかに記載の核酸結合用磁性担体。

【請求項6】 前記磁性シリカ粒子の粒子径が $0.5\sim 15\mu\text{m}$ である、請求項1から5のいずれかに記載の核酸結合用磁性担体。

【請求項7】 核酸の単離方法であって、該方法は、超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリカ粒子が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する核酸結合用磁性担体、核酸を含有する材料、および核酸抽出用溶液を混合する工程；核酸が結合した該磁性担体を磁界を用いて液体から分離する工程；および核酸を結合した該磁性担体から該核酸を溶離する工程を包含する、核酸単離方法。

【請求項8】 前記核酸が、プラスミドまたは増幅産物中の核酸である、請求項7に記載の核酸単離方法。

【請求項9】 前記核酸抽出溶液がカオトロピック物質を含有する、請求項7に記載の核酸単離方法。

【請求項10】 前記カオトロピック物質が、グアニジン塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、(イソ)チオシアン酸ナトリウム、尿素、またはこれらの組合せである、請求項9に記載の核酸単離方法。

【請求項11】 前記溶離工程において、溶離用緩衝液が用いられる、請求項7に記載の核酸単離方法。

【請求項12】 前記溶離用緩衝液が、TE緩衝液または滅菌水である、請求項11に記載の核酸単離方法。

【請求項13】 核酸の検出方法であって、該方法は、超常磁性結晶である金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリカ粒子が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する核酸結合用磁性担体、核酸を含有する試料、および核酸抽出用溶液を混合する工程；核酸が結合した該磁性担体を磁界を用いて液体から分離する工程；核酸を結合した該磁性担体から該核酸を溶離する工程；必要により得られた該核酸を増幅する工程；および

標的核酸を検出する工程を包含する、核酸検出方法。

【請求項14】 核酸単離用試薬キットであって、該キットは、超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリカ粒子が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する核酸結合用磁性担体、および核酸抽出用溶液を含む、核酸単離用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、核酸を含有する生物材料から核酸を抽出または精製し、あるいは核酸増幅産物を精製するために使用する、磁気応答粒子を含有する核酸結合用磁性担体に関する。本発明はさらに、該磁性担体および磁界を利用する、核酸を含有する生物材料からの核酸単離方法、ならびにそのための試薬キットに関する。

【0002】

【従来の技術】従来から、核酸結合用磁性担体を使用する核酸単離方法としては、生親和性分子（例えば核酸など）が共有結合し得る重合性シラン被膜により覆われた、超常磁性酸化鉄核を有する、磁気応答粒子を利用することが知られている（特開昭60-1564号公報）。

【0003】また、生親和性分子が結合し得る重合性シラン被膜により覆われた超常磁性酸化鉄を有する磁気応答粒子を用意し、リゲートを含有する試料溶液、既知量の標識リゲートおよび試料溶液中のリゲートに特異的であるリガンドが共有結合されている磁気応答粒子を反応させ、磁気応答粒子上でリガンド／リゲート複合体を形成させ、次いで磁気応答粒子を反応溶液から磁気分離し、磁気応答粒子に結合した標識リゲートまたは溶液中の遊離標識リゲートを測定し、そして標識量をリゲート濃度を測定するための標準曲線に相関させるというリゲート濃度の測定方法も知られている（特公平7-6986号公報）。

【0004】これらの方法では、磁気応答粒子に核酸を結合させるために、生親和性分子（例えば核酸）と共有結合するシラン被膜が必要である。

【0005】さらに、磁場に対し感受性を有する物質に結合した核酸配列を使用する分析法および装置についても公知である（国際出願公開番号WO86/05825）。この方法では、1本鎖核酸と結合し得る物質で被膜された磁気または磁気可能な粒子を使用し、1本鎖核酸を分離および検出する。具体的には、セルロース誘導体の1種であるニトロセルロースで磁気粒子表面を被覆し、ニトロセルロースとDNAまたはRNAの1本鎖核酸を特異的に結合させる。この方法で回収された1本鎖のDNAまたはRNAは、シーケンシング用に使用される。

【0006】この方法では、磁性担体にDNAまたはRNAの1本鎖核酸を特異的に結合させる必要がある。

【0007】核酸の精製、分離、およびハイブリダイゼーションのためにポリカチオン性支持体を使用すること、特に汚染物を含有する核酸の精製および分離のためにポリカチオン支持体を使用することもまた公知である（特表平1-502319号公報）。この方法では、具体的には、汚染物質を含む試料溶液とポリカチオン性固体支持体（磁気反応性粒子）とを接触させ、試料溶液中に含まれる汚染物を過度に結合させることなく、核酸を支持体に非共有的に結合させ、核酸が結合した支持体を溶液から分離する。ここで支持体としては、金属酸化物、ガラス、ポリアミドなどが例示され、ポリカチオン性磁気応答粒子としては、磁気アミンマイクロスフェア（磁性微小球）などが使用されている。核酸と支持体との結合は、正電荷を有する磁気アミンマイクロスフェアと核酸の負電荷を有する糖リン酸塩主鎖との間のイオン結合に基づくとされている。

【0008】さらに、内部コアポリマー粒子と、その粒子に均一に被覆している磁氣的に応答する金属酸化物／ポリマーコーティングとよりなる磁性粒子を使用する、純粋な生物材料の単離法もまた公知である（特表平2-501753号公報）。この方法は、上記粒子に生物材料を反応させ、磁性粒子を分離し、さらに磁性粒子を生物材料から分離することによる。

【0009】この方法では、ポリスチレンなどのポリマーをコアとしており、内部コア粒子に金属酸化物とポリスチレンなどのポリマーとを均一に被覆している。

【0010】オリゴヌクレオチドの複数分離を有する単一分散性（粒径差は5%以下）の超常磁性粒子、およびオリゴヌクレオチドを粒子表面の官能基（ビオチニル基）または分子に共有結合または吸着させる磁性粒子の製法が公知であり、オリゴヌクレオチドを共有結合または吸着させた粒子を核酸プローブとして使用することが公知である（国際出願公開番号WO90/06045）。

【0011】この方法では、ハイブリダイゼーションに使用する核酸プローブを特異的に共有結合または吸着させることが目的であり、上記粒子は非特異的に多量の核酸を固定する担体ではない。

【0012】以上のように、磁性粒子担体の表面上のシラン被膜またはポリマー被覆を用いる方法は、担体表面とシラン被膜またはポリマーとの結合が共有結合などの方法で行われる。これらの方法は、磁性粒子表面に官能基が付加される場合が多く、核酸などの特異的吸着による分別および測定には有利であるが、核酸を非特異的に多く吸着し、回収量も高くなる固相担体には不向きである。

【0013】一般的に核酸の単離を行うために、表面を被覆した磁性粒子を固相担体として使用する場合、大きな粒子（例えば直径が20 μ m以上）は、弱磁場および弱磁場変化に対し応答し得るが、迅速に沈澱し分散性が

悪い傾向にある。従って、固相吸着など均質的な状態を要求する反応に対しては、プラスミドDNAなどの小さい核酸を吸着固定することが難しい。また、大きな粒子は小さな粒子に比べて重量当りの比表面積が限られている。このため、これに対しては、少量の物質が結合するのみである。

【0014】小さな粒子（例えば直径が0.1 μ m以下）では、比表面積および分散性においては良好であるが、沈降性に劣る。このため、磁極による磁界分離において、必要とされる磁極には、磁力の強い大きくて高価な磁石が必要であり、磁極による分離にも長い時間を有する。

【0015】シリカ粒子を核酸の精製手段として用いる方法に関しては、従来、HPLC（高速液体クロマトグラフィー）装置の使用を前提とするクロマトグラフィーでのカラム分離が使用されている。合成した核酸または増幅した産物をカラムに通すことにより、必要な核酸がシリカ担体表面に吸着する。このカラムに洗浄液を流すことで、不純物を洗浄できる。回収する際は、別にバッファを流し、必要な核酸を回収できる。この方法では、シリカ担体から構成されるカラムを何度も使用できるメリットがある。他方、生物材料の1つである全血からの核酸単離は、目詰まりなどの問題から実施できず、回収できる核酸の量が少量になってしまうという不都合があった。しかもその装置は高価である。

【0016】シリカ粒子を固相担体として、全血、尿などの生物材料から核酸を分離する方法もまた公知である（特開平2-289596号公報、特公平7-13077号公報）。

【0017】しかし、このようなシリカ粒子を担体とした場合、遠心分離を何回も繰り返す煩雑な操作が必要である。しかも溶液を注入後、十分に混合するためにボルテックスミキサーなどで強い振動による混合操作が必要であるため、振動により試料に含まれる核酸が切れ、長鎖核酸が得られにくいという問題がある。

【0018】以上のように、非特異的に多量の核酸を簡便に固定するには、種々の問題がある。

【0019】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明は、核酸を非特異的に多く吸着させることが可能な磁性粒子担体を提供することを目的とする。本発明はさらに、この磁性担体を用いる核酸単離方法およびそのための試薬キットもまた提供する。

【0020】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意検討した結果、比表面積が特定な範囲にある磁性シリカ粒子が良好な結果を奏することを見だし、本発明に到達した。

【0021】本発明の核酸結合用磁性担体は、超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリ

カ粒子が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する。

【0022】また、本発明の核酸単離方法は、超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリカ粒子が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する核酸結合用磁性担体、核酸を含有する材料、および核酸抽出用溶液を混合する工程、核酸が結合した磁性担体を磁界を用いて液体から分離する工程、および核酸を結合した磁性担体から核酸を溶離する工程を包含する。

【0023】さらに、本発明の核酸検出方法は、超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリカ粒子が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する核酸結合用磁性担体、核酸を含有する試料、および核酸抽出用溶液を混合する工程、核酸が結合した磁性担体を磁界を用いて液体から分離する工程、核酸を結合した磁性担体から核酸を溶離する工程、必要により得られた核酸を増幅する工程、および標的核酸を検出する工程を包含する。

【0024】さらに、本発明の核酸単離用キットは、超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリカ粒子が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する核酸結合用磁性担体、および核酸抽出用溶液を含む。

【0025】

【発明の実施の形態】本発明の核酸結合用磁性担体は、超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子である。本発明の磁性シリカ粒子は、核酸を結合し、かつ磁界により固体と液体との分離を可能とする。

【0026】本発明の磁性シリカ粒子は、比表面積が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ である。この比表面積は、JIS K1150「シリカゲル試験方法」で規格化された測定法である窒素ガス吸着法で測定される。上記磁性シリカ粒子の比表面積が、 $100\text{m}^2/\text{g}$ 未満であると、核酸吸着量が小さく、核酸回収率が悪くなる。比表面積が $800\text{m}^2/\text{g}$ を越えると、製法上、細孔容量が極端に大きくなり、溶離による回収液が減少し、核酸回収率が悪くなる。

【0027】好ましい実施態様では、本発明の磁性シリカ粒子は、以下のような構造を有している。上記超常磁性金属酸化物が、その表面がシリカで被覆されており、そしてさらに微小なシリカ粒子で構成される無機多孔性壁物質で複合されている。この磁性シリカ粒子は、ほぼ完全な球状である。核酸と磁性シリカ粒子とは、シリカ表面の水酸基と核酸の塩基との間で生じる水素結合により結合されている。

【0028】本発明で用いられる超常磁性金属酸化物とは磁場変化度に応答するが、永久磁化はされず、残留磁化が小さい金属酸化物をいう。

【0029】好ましい超常磁性金属酸化物としては、酸化鉄が挙げられる。この酸化鉄としては、四三酸化鉄(Fe_3O_4)および四三酸化鉄を徐々に酸化して得られ

るr型三二酸化鉄(rFe_2O_3)などが用いられる。その粒径は、好ましくは $0.2\sim 0.4\mu\text{m}$ である。この四三酸化鉄は残留磁気が小さく、さらに好ましい表面構造(ほぼ球形)を有するため、磁気分離および再分散のサイクルを反復することが可能である。四三酸化鉄を含有する磁性シリカ粒子は、弱酸性の水溶液中で安定であり、2年以上も貯蔵可能である。

【0030】本発明の磁性シリカ粒子中に含まれる超常磁性金属酸化物の量は、磁極の強さにもよるが、 $10\sim 60\text{wt}\%$ が好ましく、さらに好ましくは $20\sim 40\text{wt}\%$ である。この好ましい範囲内では、磁性担体は、市販の磁石を使用して迅速に分離できる。

【0031】さらに、上記磁性シリカ粒子の表面細孔直径は、 $0.1\sim 60\text{nm}$ 、好ましくは $0.5\sim 10\text{nm}$ であり、そして細孔容積は、 $0.01\sim 1.5\text{ml}/\text{g}$ 、好ましくは $0.1\sim 0.5\text{ml}/\text{g}$ である。これら表面細孔直径および細孔容積は、窒素ガス吸着法により測定される。これらの測定法は、JIS K1150「シリカゲル試験法」で規格化されている。

【0032】表面細孔直径により、比表面積、細孔容積は決まる。表面細孔直径が大きい方が比表面積は大きく、細孔容積もまた大きい傾向にある。比表面積は大きい方が核酸の吸着量は増えるが、細孔容積も大きいと回収量が減る傾向にある。表面細孔直径および細孔容積が上記範囲内にあれば、核酸の最終回収率は高い。

【0033】上記磁性シリカ粒子の粒子径は、 $0.5\sim 15\mu\text{m}$ 、好ましくは $1\sim 10\mu\text{m}$ である。この磁性シリカ粒子は、上記粒子径の範囲内にることにより、混合による分散性に優れる。

【0034】本発明の磁性シリカ粒子は、以下を満たすものが最も好ましい：①超常磁性酸化鉄を含む磁性シリカ粒子であって、②その比表面積が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ であり、③上記酸化鉄が、シリカで被覆されており、④さらに微小シリカ粒子で構成される無機多孔性壁物質で複合されており、⑤上記酸化鉄の重量が $10\sim 60\text{wt}\%$ であり、⑥磁性シリカ粒子の表面細孔直径が $0.1\sim 60\text{nm}$ であり、⑦磁性シリカ粒子の細孔容積が $0.01\sim 1.5\text{ml}/\text{g}$ であり、そして⑧磁性シリカ粒子の粒子径が $0.5\sim 15\mu\text{m}$ である。

【0035】本発明の磁性シリカ粒子は、例えば、特開平6-47273号公報に記載の方法により製造され得る。例えば、四三酸化鉄を、テトラエトキシシランのアルコール溶液に添加し、超音波分散機により分散湿潤させる。これにテトラエトキシシランの加水分解触媒を加え、超音波分散させながら、四三酸化鉄の表面にシリカを沈着させる。このようにして得られた分散液に、ケイ酸ナトリウムを加え、有機溶媒および界面活性剤(ソルビタンモノステアレート)のトルエン溶液を加えて乳化し、W/O型エマルジョンを形成させる。この乳濁液を硫酸アンモニウム水溶液に添加し、充分攪拌させる。そ

の後、逕過分離、水洗、アルコール沈殿を行い、乾燥させることにより、所望の球状シリカ粒子が得られる。

【0036】本発明の磁性シリカ粒子は、一般の磁性粒子に比較して、比表面積が非常に大きいため、多量の核酸を非特異的に吸着させることができる。さらに分散性もよいため、核酸を含有する材料および核酸抽出液との混合が簡単であり、溶離液による核酸の回収量が高い。

【0037】本発明の磁性シリカ粒子を用いる核酸単離方法は、超常磁性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリカ粒子が $100\sim 800\text{m}^2/\text{g}$ の比表面積を有する核酸結合用磁性担体、核酸を含有する材料、および核酸抽出用溶液を混合し、核酸が結合した磁性担体を磁界を用いて液体から分離し、そして核酸を結合した磁性担体から核酸を溶離することを包含する。

【0038】核酸結合用磁性担体、核酸を含有する試料、および核酸抽出用溶液を混合する工程は、例えば市販のボルテックスミキサーを用いて行われ得る。この工程は、チューブを軽く転倒攪拌あるいは振盪することによっても十分に行われ得る。

【0039】核酸が結合した担体を磁界を用いて液体から分離する工程は、磁石を用いて行われ得る。この磁石は、例えば、磁束密度が約300ガウスの磁石が用いられ得る。具体的には、核酸結合磁性担体、核酸を含有する試料、および核酸抽出用溶液を含むチューブの側壁に磁石を近づけ、核酸結合担体をチューブ側壁に集め、核酸抽出用溶液などの溶液と分離する方法がある。

【0040】核酸を結合する担体から核酸を溶離する工程は、核酸が結合した磁性担体を、例えば約70%エタノールで数回洗浄した後、磁性担体を乾燥し、その後、滅菌水やTE緩衝液などの低イオン濃度の溶液を添加することにより、磁性担体に結合した核酸を低イオン濃度の溶液から溶離し得る。

【0041】本発明の核酸単離法では、磁性担体にDNAまたはRNAの1本鎖核酸を特異的に結合させる必要はない。

【0042】本発明方法に使用する核酸を含有する材料は、蛋白質、膜、DNAまたはRNA、低分子量核酸などを含む生物材料である。このような生物材料としては、蛋白質、膜、DNAまたはRNA、低分子量核酸などを含むバクテリオファージ、ウイルス、細菌あるいはこれらの組み合わせが例示される。また、精製する目的のために、この核酸が、プラスミドまたは増幅産物中の核酸であってもよい。

【0043】本発明で使用される核酸抽出用溶液としては、カオトロピック物質、EDTA、トリス塩酸などを含有する緩衝液が挙げられる。カオトロピック物質としては、グアニジン塩、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、(イソ)チオシアン酸ナトリウム、尿素などが例示される。それらは組合せて使用してもよい。その濃度は、約1~10モル/l程度が好ましい。

【0044】本発明における好ましい核酸抽出用溶液には、例えば、グアニジンチオシアン酸塩、Triton X-100、トリス/塩酸緩衝液が含まれる。

【0045】核酸を最終的に溶離し回収するために、TE緩衝液、滅菌水などの溶離用緩衝液が用いられ得る。

【0046】本発明の磁性シリカ粒子を固相担体として使用する核酸単離方法では、多孔質ガラスまたは磁気微小球を使用する場合に比べて、固相担体の比表面積が数倍大きくなり、このため、核酸の回収率もまた高い。

【0047】本発明の核酸単離方法によると、核酸抽出後の支持体への結合を高濃度の塩溶液中で行うことができる。また、溶出は、イオン強度が低い滅菌水またはTE緩衝液中で行うことができる。

【0048】本発明の核酸単離方法の一例として、以下の手順が挙げられる。

【0049】(1) エッペンドルフチューブに、核酸抽出用溶液を入れ、次に全血サンプルを注入し、混合する。

【0050】(2) その後、磁性シリカ粒子溶液を加える。

【0051】(3) 適当な時間間隔をあけて混合しながら、静置する。

【0052】(4) エッペンドルフチューブの形状に合った磁極スタンドに、上記チューブを設置することで、磁性シリカ粒子を磁極側のチューブ側壁に集める。

【0053】(5) フィルターチップで溶液を吸引し排出する。

【0054】上記溶液はデカンテーション(磁極スタンドに設置したまま、スタンドを逆さにする)により排出する方法もあるが、廃液の飛散によるコンタミネーションの問題があるため、フィルターチップで吸い出すことが好ましい。

【0055】(6) チューブを磁極スタンドより取り出し、グアニジンチオシアン酸塩を含む洗浄液を注入する。

【0056】(7) 磁性シリカ粒子と十分混合した後、磁極スタンドに設置し、上記と同様にして溶液を廃棄する。

【0057】(8) 洗浄操作を再度、繰り返す。

【0058】(9) 適当な有機溶媒、例えば約70%エタノールで上記と同様な方法により、核酸の吸着した磁性シリカ粒子を洗浄し、高濃度のグアニジンチオシアン酸塩を取り除く。

【0059】(10) 再度、適当な有機溶媒、例えば約70%エタノールおよびアセトンで洗浄する。

【0060】(11) 適温(約56℃)のヒートブロックに上記チューブを設置し、放置してチューブ内および磁性シリカ粒子内の上記の有機溶媒を完全に蒸発させて除く。

(12) 滅菌水を加え、適温(約56℃)のヒートプロ

ックに上記チューブを設置し、(3)の操作を繰り返す。

【0061】(13)磁極スタンドに設置し、回収する溶液をフィルターチップで吸引し、別の新しいチューブに移す。

【0062】(14)保存する場合は、適温(-70℃)で行なう。

【0063】本発明の核酸単離法にて単離された核酸は、さらに必要により核酸増幅法によって増幅し、検出プローブにて検出することができる。

【0064】核酸増幅法には、PCR法、NASBA法などが適用され得る。核酸の増幅法としては、例えば下記工程A~Dを包含する方法が挙げられる。

【0065】A. 必要により標的核酸を変性して、1本鎖核酸とする工程

B. 上記1本鎖核酸と、標的核酸に相補的な塩基配列を有する正方向および逆方向のプライマーおよび4種のdNTPとを熱安定性DNAポリメラーゼを含む緩衝液中で反応させて、1本鎖核酸に上記プライマーをアニールさせ、プライマー伸長反応を行う工程

C. プライマー伸長物を分離して、1本鎖とする工程、および

D. 上記工程BおよびCを繰り返す工程。

【0066】本発明では、必要により上記増幅反応により生成した増幅産物に、例えば標識プローブをハイブリダイズさせることにより、標的核酸を検出する。

【0067】標識プローブとしては、標的核酸に相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであり、標識物質または標識結合物質を結合するものが使用され得る。

【0068】標識物質としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼなどの酵素、蛍光物質、および放射性物質が挙げられる。標識結合物質としては、ビオチン、ジゴキシゲニンなどが例示される。標識物質は、ビオチン、ジゴキシゲニン、あるいはアビジンを介して結合され得る。

【0069】これらの標識をプローブに導入する方法には、例えば、これらの標識物質または標識結合物質を結合するdNTPを使用して合成する方法が含まれる。

【0070】標識プローブと結合した核酸の検出方法としては、従来公知の方法、例えばサザンハイブリダイゼーション法およびノーザンハイブリダイゼーション法が挙げられる。

【0071】標識の検出において、例えば標識物質としてアルカリホスファターゼを使用した場合、化学発光基質、例えば1,2-ジオキセタン化合物(PPD)を反応させると、ハイブリッドを形成した核酸のみが発光する。これをX線フィルムに感光することにより、標的核酸の大きさおよび電気泳動上での位置を確かめることができる。

【0072】本発明の核酸単離用試薬キットは、超常磁

性金属酸化物を含む磁性シリカ粒子であって、該磁性シリカ粒子が100~800m²/gの比表面積を有する核酸結合用磁性担体、および核酸抽出用溶液を含む。

【0073】上記試薬キットに含まれる磁性担体および核酸抽出用溶液は、上記記載の通りである。

【0074】本発明の磁性シリカ粒子は、一般の磁性粒子に比較して、比表面積が非常に大きいため、多量の核酸を非特異的に吸着させることができる。さらに分散性もよいため、核酸を含有する材料および核酸抽出液との混合が簡単であり、溶離液による核酸の回収量が高い。従って、これを用いることにより、核酸の回収量に優れた核酸の単離および検出方法、および核酸単離用試薬キットが提供される。

【0075】

【実施例】以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0076】本発明の実施例は、以下の磁性シリカ粒子を用いて行った。

【0077】磁性シリカ粒子としては、粒径の範囲が1~10μm、四三酸化鉄粒子の含有量が30wt%、比表面積が400m²/g、細孔容積が0.15ml/g、表面細孔直径が約1.20nmであるもの(鈴木油脂製)を使用した。

【0078】磁性シリカ粒子の粒径、比表面積、細孔容積、および表面細孔直径は、JISK1150「シリカゲル試験法」で規格化されている測定法に従って測定したものである。

【0079】この磁性シリカ粒子は、粉末では水溶液中に直ちに溶解しないため、粉末状で使用する場合、操作性において煩雑になる。よって、0.5g/ccになるよう滅菌水に溶解したものを準備した。

【0080】(実施例1 生物材料からの核酸の単離方法)生物材料としては、MRSA(メチシリン耐性黄色ブドウ球菌)陽性の全血サンプルを用い、核酸抽出用溶液としては5Mグアニジンチオシアン酸塩およびTriton X-100を含むトリス/塩酸緩衝液を使用した。洗浄液も5Mグアニジンチオシアン酸塩を含むトリス/塩酸緩衝液を使用した。高濃度の塩を除去するために70%エタノール溶液およびアセトン溶液を使用し、固相担体には結合した核酸を回収するための溶離液として滅菌水を使用した。

【0081】本発明の具体的な操作としては

(1) 1.5cc用エッペンドルフチューブに、核酸抽出用溶液900μlを入れ、次に全血サンプル100μlを注入し、混合した。

【0082】(2)その後、磁性シリカ粒子溶液140μlを加えた。

【0083】(3)約2分毎に混合しながら、室温で10分間置いた。

【0084】(4)1.5cc用エッペンドルフチューブ

ブの形状に合った磁極スタンドに、上記チューブを設置することにより、磁性シリカ粒子が磁極側のチューブ側壁に集めた。

【0085】(5) フィルターチップで溶液を吸引し排出した。

【0086】(6) チューブを磁極スタンドより取り出し、グアニジンチオシアン酸塩を含む洗浄液を1cc注入した。

【0087】(7) 磁性シリカ粒子と十分混合した後、同様に磁極スタンドに設置し上記と同様にして溶液を廃棄した。

【0088】(8) 洗浄操作を再度繰り返した。

【0089】(9) 1ccの70%エタノールで上記と同様の方法により、核酸の吸着した磁性シリカ粒子を洗浄し、高濃度のグアニジンチオシアン酸塩を取り除いた。

【0090】(10) 再度、1ccの70%エタノールおよび1ccアセトンで洗浄した。

【0091】(11) 約56℃のヒートブロックに上記チューブを設置し、約10分放置してチューブ内、および磁性シリカ粒子内のアセトンを完全に蒸発させ除いた。

【0092】(12) 100 μ lの滅菌水を加え、約56℃のヒートブロックに上記チューブを設置し、2分毎

に混合操作をしながら10分間置いた。

【0093】(13) 磁極スタンドに設置し、回収する溶液をフィルターチップで吸引し、別の新しいチューブに移した。通常回収量は70 μ l程度である。

【0094】(14) 保存する場合は、-70℃で行った。

【0095】上記方法により回収された核酸は、吸光度計によりその吸光度(OD 260nm)を測定して、核酸の濃度を求めた。回収量はこれに回収容量をかけて求めた。

【0096】(比較例1) 比較のために、市販の核酸抽出用キットIsoquick(マイクロプロブ製)を使用した。この比較の試薬キットでは、次のようにして核酸の抽出を行った。まずカオロビック物質で細胞膜の破壊およびヌクレアーゼ活性の阻害を行い、次に抽出溶液により核酸を水相に、その他の物質を有機相に残すように分離し、そしてアルコール沈殿などで水相から核酸を取り出した。

【0097】上記方法により回収された核酸は、実施例1と同様にして、核酸濃度および回収量を求めた。

【0098】実施例1および比較例1の結果を以下の表1に示す。

【0099】

【表1】

	実施例1	比較例1
回収量 (ng)	108.0	74.5

【0100】表1から明らかなように、実施例1(本発明方法)では核酸の回収量が高かった。

【0101】(実施例2 MRSA既知濃度核酸サンプルによる添加回収試験) 実施例1と同じ磁性シリカ粒子を用いた核酸単離方法での抽出効率を見るために、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)を培養後、濃度(菌数)を算出しておき、菌体をAPGC(アシッドグアニジウムチオシアネートフェノール・クロロホルム)法で抽出した核酸を全血に添加したものを、サンプルとして準備した。

【0102】(サンプル) 10⁴個/100 μ lまたは10⁵個/100 μ lの核酸溶液を各100 μ lずつ全血に添加したもの。

【0103】(核酸抽出法) 実施例1の単離方法と同様にして行った。

【0104】(増幅法) mecA遺伝子配列から最適な2種のプライマー(配列番号1および2)を使用し、PCR法を実施した。条件としては94℃で1分間、55℃で1分間、および75℃で1分間を、30サイクル繰

り返した。

【0105】(検出法) 核酸の検出には、以下のようなドットプロット法を用いた。mecA遺伝子配列からプローブ(配列番号3)を作製した。プローブをアルカリホスファターゼ標識し、増幅後のサンプルをこのプローブとサンドイッチハイブリダイゼーションし、発光基質である1,2-ジオキセタン化合物(PPD)を添加後、発光量を検出した。

【0106】(添加回収効率) 発光量より、添加回収量を計算により求めた。その結果を表2に示す。

【0107】(比較例2) 市販の核酸抽出キット、Isoquick(マイクロプロブ社製)を用いて核酸抽出を行った。核酸抽出は、比較例1と同様に行い、核酸の添加回収量を求めた。

【0108】実施例2および比較例2の結果を以下の表2に示す。

【0109】

【表2】

サンプル	実施例2	比較例2
10 ⁶ 個/100 μ l	50%	12%
10 ⁴ 個/100 μ l	30%	10%

【0110】表2から明らかなように、実施例2（本発明方法）は、核酸の添加回収率が高かった。

【0111】（実施例3 直鎖状のDNA断片の添加回収実験）生物材料としては、健康人の全血サンプルを用い、このサンプルに下記直鎖状のDNA断片を添加して、上記DNA断片を単離した。生物材料からの核酸の単離方法は、実施例1と同様に行った。

【0112】（直鎖状DNA断片）10ng/ μ l pBluescript II/ScaI断片（2.96kbp）または40ng/ μ l γ /HindIII消化物。

【0113】（検出）実施例2と同様にして、回収したサンプルをドットプロット法にて検出した。色差計での定量、回収液量から、回収率を求めた。その結果を表3および表4に示す。

【0114】（比較例3）比較のために、生物試料を専用抽出溶液で抽出した後、核酸をシリカレジンを吸着し、シリカレジンをフィルターカップに集めた後、洗浄

を行い最後にその核酸を滅菌数または低濃度のTE緩衝液で溶出させ、ClearCut Miniprep Kit（Stratagene製）を使用した。この操作は以下の通りに行った。

【0115】（1）専用チューブに100 μ lのサンプル、100 μ lのSolution3および10 μ lのシリカ懸濁液を入れた。

【0116】（2）混合後、スピンカラムで粒子を集め、上清を除去した。

【0117】（3）500 μ l洗浄液で2回洗浄した。

【0118】（4）100 μ l TE緩衝液を加え、上清を回収した。

【0119】実施例3および比較例3の結果を以下の表3および表4に示す。

【0120】サンプル：10ng/ μ l pBluescript II/ScaI

【0121】

【表3】

	実施例3	比較例3
回収率	50%	40%

【0122】サンプル：40ng/ μ l γ /HindIII

【0123】

【表4】

	実施例3	比較例3
回収率	30%	20%

【0124】表3および4から明らかなように、直鎖DNA断片を含むサンプルでも本発明方法は、DNA断片の回収率が高かった。

【0125】

【発明の効果】本発明の磁性シリカ粒子を使用した核酸単離方法は、非特異的に多量の核酸を吸着でき、回収効率に優れる。本発明は、操作性にも優れるため、研究用途、多量の検体を短時間で処理する必要な臨床検体の前処理などに使用できる。DNAおよび/またはRNAを効率よく抽出できるため、本発明は、各種核酸増幅法の前処理としても使用できる。本発明は、磁界による分離のため、自動化しやすいという利点も有する。

【0126】

配列

GAACCTCTGC TCAACAAGTT

【0129】

【配列番号：2】

【配列表】

【0127】

【配列番号：1】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

存在位置：1..20

特徴を決定した方法：S

他の情報：ブドウ球菌の配列と相補的な配列を有する。

【0128】

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：両形態
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：他の核酸 合成DNA
 配列の特徴

配列
 AAATTTGAAA AAGGCATGAA

【0131】
 【配列番号：3】

配列の長さ：27
 配列の型：核酸
 鎖の数：両形態
 トポロジー：直鎖状

配列
 TAGAATCATC AGATAACATT TTCTTG

【0133】
 【配列番号：4】

配列の長さ：25
 配列の型：核酸
 鎖の数：両形態
 トポロジー：直鎖状

配列
 TAGAGTAGCA CTCGAATTAG GCAGT

存在位置：1..20
 特徴を決定した方法：S
 他の情報：ブドウ球菌の配列と相補的な配列を有する。
 【0130】

20

拝読の種類：他の核酸 合成DNA
 配列の特徴
 存在位置：1..27
 特徴を決定した方法：S
 他の情報：ブドウ球菌の配列と相補的な配列を有する。
 【0132】

27

拝読の種類：他の核酸 合成DNA
 配列の特徴
 存在位置：1..25
 特徴を決定した方法：S
 他の情報：ブドウ球菌の配列と相補的な配列を有する。
 【0134】

25

フロントページの続き

(51)Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/50			G 0 1 N 33/50	P
			33/552	
			33/553	
/(C 1 2 N 15/00	Z N A			
C 1 2 R 1:445)				